



TITLE:

Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Funakoshi, Shunsuke

CITATION:

Funakoshi, Shunsuke. Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes. 京都大学, 2016, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19595>

RIGHT:

許諾条件により本文は2016-07-08に公開

京都大学	博士（ 医 学）	氏 名	舟 越 俊 介
論文題目	Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes (至適化した iPS 細胞由来心筋細胞による、細胞移植後の生着、増殖、治療効果の評価)		
(論文内容の要旨)			
<p>重症心不全患者に対する治療として、心臓移植治療が根治術として挙げられるが、ドナー不足であり、代わりうる治療法として、ヒト iPS 細胞由来心筋を用いた心筋細胞移植に期待が寄せられている。これまで、小動物を用いた幾つかの研究が報告されているが、治療効果は限られている。その原因として移植細胞の生着不良が挙げられる。そこで、本論文では、どの分化段階が生着における至適細胞であるかを同定し、生着率を上昇させることができるかどうかを検証した。</p> <p>まず、iPS 細胞を効率よく心筋細胞に分化させる分化誘導プロトコールを樹立し、心筋特異的 MYH6 プロモーター下流に GFP を発現させたレポーター細胞を作成した。分化誘導 8、20、30 日目の心筋細胞をフローサイトメーターにて純化し、それぞれの遺伝子発現をマイクロアレイにて比較したところ、分化過程に伴い心筋サルコメア関連、イオンチャネル関連遺伝子の成熟化が認められ、また細胞周期関連、細胞接着関連遺伝子にも分化段階による違いが認められた。</p> <p>次に、移植後の生着率を定量評価するため、上記のレポーター細胞にルシフェラーゼを恒常的に発現させ、in vivo imaging (IVIS)を用いて生着細胞数を経時的に定量化できる実験系を確立した。25 万個の未分化 iPS 細胞、分化4日目細胞、分化8、20、30 日目心筋細胞を免疫不全マウス (NOG) の正常心臓に直接注入し、2ヶ月間観察した。結果、分化 20 日目の心筋が最も高い生着率を示した。また、虚血心臓に対する生着能も比較するため、急性心筋梗塞 NOG マウスの心臓に同様の分化5段階の細胞を注入し、生着能を比較した。すると、正常心臓に注入した場合と同様に分化20 日目心筋細胞が高い生着能を有することが確認された。以上の結果から、分化20 日目心筋細胞が移植後生着における至適細胞であることが明らかとなった。</p> <p>次に至適細胞を用いた細胞移植治療の治療効果、生着細胞の変化を長期的に観察した。以前より、注入細胞数が多いほど、生着心筋の移植片領域が拡大することが報告されていたため、より良い生着を期待し、100 万個の分化20 日目心筋細胞を心筋梗塞 NOG マウス心臓に注入し、細胞を注入しないコントロール群との間で、心機能比較を行った。結果、コントロール群に比べ、細胞治療群で心筋梗塞後の心機能低下が抑制されており、治療効果が確認された。また、移植後3、6ヶ月の組織所見では、梗塞領域内に広範な心筋細胞生着を認め、また、生着心筋の時間経過に伴う成熟化も認められた。in vivo imaging のシグナルが移植後3ヶ月の間に移植直後の7倍にまで増加しており、生着後に心筋が増殖している可能性が示唆されたため、増殖マーカーである Ki67 で生着心筋を免疫染色したところ、移植1ヵ月後で高い Ki67 陽性心筋が観察され、心筋細胞の生着後の一過性細胞周期活性化が確認された。</p> <p>以上のことから、iPS 細胞由来心筋細胞は至適化することにより非常に良好な生着が得られ、治療効果も有することが明らかになった。また、このマウス移植モデルを用いて生着心筋細胞の経時的な表現型変化を容易に長期間観察することが可能であり、移植後、心筋細胞は一旦増殖し、その後成熟化が進行することも明らかにすることができた。</p>			

<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>重症心不全に対する心臓移植に代わりうる治療法として、ヒト iPSC 細胞由来心筋を用いた心筋細胞移植に期待が寄せられている。すでに幾つかの研究成果が報告されているが、移植細胞の生着は非常に悪く、治療効果は限られているのが現状である。そこで、本研究では、iPS 細胞由来心筋の表現型が分化誘導中に変化していくことに注目し、どの分化段階が最も高い生着能を有するかを検証した。</p> <p>未分化 iPSC 細胞、分化4日目細胞、分化8、20、30 日目心筋細胞、それぞれ 25 万個を免疫不全マウス (NOG) の心臓に直接注入し、生着率を比較した結果、分化20 日目心筋細胞が最も高い生着能を有することが分かった。さらに細胞数を 100 万個に増やし、心筋梗塞を起こした心臓に、分化20 日目心筋細胞を移植したところ、6 ヶ月にわたり心臓障害部位に広範な移植細胞の生着が認められ、加えて移植による治療効果も確認された。この細胞移植モデルにより、長期間生着する移植心筋細胞の検討が可能となり、生着心筋細胞が移植後 1–2 ヶ月間の増殖期から、その後の成熟期へと移行していく様子が観察された。</p> <p>以上の結果は、iPS 細胞を用いた心臓再生治療応用に向けての重要な知見であると考えられた。今後は、ヒトへの臨床応用に向け、この移植モデルによる更に詳細な移植細胞の観察や、中・大動物への移植実験での治療効果、安全性の更なる検討が必要であると考えられた。</p> <p>したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成28年 2月16 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
要旨公開可能日： 年 月 日以降			